

版本号:250306

RNApure Total RNA Kit
RNApure 高纯总 RNA 快速提取试剂盒

目录号: RN03

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	50 次(RN0301)
TRIpure Reagent (4°C 避光)	50 ml
去蛋白液 PE	16 ml 第一次使用前按瓶子标签指示加无水乙醇
漂洗液 RW	10 ml 第一次使用前按瓶子标签指示加无水乙醇
RNase-free H ₂ O	5 ml
RNase-free 吸附柱 RA	50 个
收集管 (2 ml)	50 个

本试剂盒（除低温组分外）在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. 运输和储存均在室温下（15°C–25°C）进行。TRIpure Reagent 可以常温运输，收到后 **4°C 避光可长期保存，常温保存 3 个月也不影响使用质量。**
2. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

❖ 产品介绍:

改进的异硫氰酸胍/酚一步法（TRIzol 法）裂解细胞和灭活 RNA 酶，然后总 RNA 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤，去蛋白液和漂洗液将细胞代谢物、蛋白等杂质去除，最后低盐的 RNase free water 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

❖ 产品特点：

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。
2. 结合了异硫氰酸胍/酚一步法试剂稳定性好，纯度高和离心柱方便快捷的优点，不需要异丙醇沉淀和乙醇洗涤过程，RNA 可以直接从离心柱上洗脱避免了过度干燥不易溶解问题。
3. TRIpure Reagent 对应 Thermofisher/Invitrogen 的 TRIzol(Thermofisher 货号：15596026)，可以有效的消除基因组污染。效果和进口一致。
4. 多次漂洗去蛋白过程，提取 RNA 纯度更高。
5. 有效的去除了 5S 在总 RNA 中含量，提高了纯度。

❖ 注意事项

1. 本试剂盒抑制RNA酶效果极佳，所有离心步骤如未加说明，均可在常温进行。
2. TRIpure Reagent和去蛋白液PE中含有刺激性有害化合物，操作时要戴乳胶手套，**避免沾染皮肤、眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。**
3. 考虑到环保问题，本试剂盒不含有实验室常用试剂氯仿，使用前需要自备氯仿（或者购买艾德莱氯仿替代试剂，货号：RN66）。
4. 常规的琼脂糖凝胶电泳和甲酰胺变性胶电泳均可以用来分析RNA的质量。好的RNA产物在变性电泳后应该可以看到明显的二条优势核糖体RNA带，分别为~5 Kb（28S），~2 Kb（18S）（注意普通的琼脂糖电泳，28S和18S大约在2 Kb和1 Kb位置，而且可以随着RNA空间二级结构不同，电泳条带所在位置不是固定的），条带亮度比值约为2:1。有时候也可以看到~0.1 kb和0.3Kb(5S, tRNA)带。但有时候根据不同的物种如某些植物组织可以看到4, 5条带也属于正常现象，如果RNA未成熟的前体或者不均一核RNA、小核RNA提取出来也可能看到介于7 Kb和15 Kb之间的不连续的高分子量条带
5. 检测OD₂₆₀/OD₂₈₀吸光度比值时，如需稀释RNA样品应该用TE（PH 8），如果用水稀释后检测，由于一般水离子强度和PH值低，会使OD₂₈₀升高，从而使比值降低。

6. 加入TRIpure匀浆后，加氯仿前，样品可在 -60°C 至 -70°C 保存一个月以上。
7. 若提取细菌RNA，推荐EASYspin系列细菌RNA提取试剂盒（目录号：RN43）。

❖ **操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）**

⇒ 第一次使用前按照漂洗液 RW 和去蛋白液 PE 瓶子标签指示加入无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框打钩标记已加入，以免多次加入！

1. 匀浆处理

a. 组织

将组织在液氮中磨碎，每50~100 mg组织加1 ml的裂解液TRIpure后匀浆。组织样品容积不能超过TRIpure容积的10%。

b. 单层生长的细胞

直接往直径3.5 cm的培养板中加入1 ml的TRIpure溶解细胞，并用移液枪轻轻吹打混匀。依据培养板的面积而不是依据细胞的数量来决定所需的TRIpure量（每10 cm²加1 ml）。一般情况下，普通大小的细胞培养瓶，加入1 ml的TRIpure，迅速轻摇使TRIpure充分和瓶底所有细胞接触裂解细胞并灭活RNA酶，轻轻用移液枪反复吹打混匀。当TRIpure量不足时可能导致抽提的RNA中污染有DNA。

▲**注意：**贴壁培养细胞往往不能完全从培养瓶（皿）脱落，这并不意味着裂解不完全，此时细胞膜实际已经完全破裂开，并已释放出全部RNA，继续做即可。

c. 悬浮生长的细胞

通过离心来沉淀细胞，小心弃上清。每5~10×10⁶的动物细胞，植物细胞加1 ml的TRIpure。在TRIpure试剂中用移液枪反复吹打来裂解细胞。在加入TRIpure前应避免洗涤细胞，否则会增加mRNA降解的可能性。

2. 将匀浆样品剧烈震荡混匀，在15~30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育5 min以使核蛋白体完全分解。
3. **可选步骤：**4 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下12,000 rpm 离心10 min，小心取上清转入一个新的1.5 ml的离心管中。当样品富含蛋白质、脂肪、多糖或是细胞外物质例如肌肉、脂肪组织或植物的块茎部分时可能需要额外的分离步骤。
匀浆化后在2~8 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下以12,000 rpm离心10 min，移除匀浆中不溶

解的物质，余下的沉淀中包含有细胞外膜、多糖、以及高分子量DNA，而上清含有RNA。

4. 每1ml TRIpure加0.2 ml氯仿。盖紧样品管盖，剧烈振荡15 sec并将其在室温下孵育2 min。

▲如果氯仿无法获得，可以购买艾德莱的氯仿替代试剂（货号：RN66）

5. 于4°C 12, 000rpm 离心10 min，样品会分成三层：下层有机相，中间层和上层无色的水相，RNA存在于水相中。水相层的容量大约为所加 TRIpure体积的50%，把水相小心转移到新管中（不要触碰中间层），记录水相体积。
6. 加入水相体积一半也就是0.5倍体积的无水乙醇，混匀（此时可能会出现沉淀）。得到的溶液和可能沉淀一起转入吸附柱RA中（吸附柱套在收集管内，若一次不能将全部溶液和混合物加入吸附柱RA中，请分两次转入吸附柱RA中。），室温（以下步骤均为室温）12, 000 rpm 离心30 sec，弃废液，将吸附柱重新套回收集管。
7. 加 500 µl 去蛋白液 PE（请先检查是否已加入无水乙醇!），12, 000 rpm 离心 30 sec，弃废液。
8. 加入500 µl漂洗液RW（请先检查是否已加入无水乙醇!），12, 000 rpm 离心15 sec，弃废液。
9. 重复步骤8一次。
10. 将吸附柱RA放回空收集管中，12, 000 rpm离心2 min，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
11. 将吸附柱RA转移至新的1.5 ml离心管中，向吸附柱膜中央悬空滴加50-80 µl的RNase-free ddH₂O，静置2 min，12, 000 rpm离心1 min。
▲洗脱体积建议不少于 30 µl，体积过小会影响核酸回收效率。
▲以下步骤都可以帮助提高 RNA 产物浓度：
RNase-free ddH₂O 于洗脱前先在 70-90°C 预热；
将第一次洗脱液重新加入吸附柱进行第二次洗脱。